

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850016

研究課題名(和文)セイヨウナシ枝変わりの赤着色変異機構の解明と育種の利用

研究課題名(英文)The elucidation and the application for breeding of red skin coloration mechanism of bud sport of European pear

研究代表者

池田 和生 (IKEDA, Kazuo)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：80555269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：セイヨウナシの果実は通常、緑または黄色い果皮を示すが突然変異により赤い果皮を示す品種がいくつか存在する。本研究では、赤く着色する形質が日光を必要とするアントシアニンの蓄積によるものであることが明らかとなった。また、果皮の赤着色には全面着色タイプと陽光面着色タイプの品種が存在するが、アントシアニンの蓄積パターンは着色タイプではなく各品種固有の蓄積メカニズムを示すことが示唆された。このアントシアニン蓄積に関わる遺伝子のゲノム構造を確認したところ各遺伝子の近辺に大きな欠損や挿入等は認められず、1塩基多型等のわずかな変異もしくは非転写領域の変異に起因するものである可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The pear fruits usually show green or yellow skin, but some cultivars show red skin caused by bud mutation. In this study, we found that these red skin color was caused by accumulation of the anthocyanin and it required sunlight. Also, solid type and brush type was present in red skin cultivars, but it was suggested that each red skin cultivar has inherited accumulation pattern except for coloration type. Gene expression analysis and DNA blot analysis of genes correlated with anthocyanin accumulation showed large size deletion or insertion did not exist in coding region of those genes, suggesting exist of SNPs or deletion/insertion in non-coding region.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：セイヨウナシ 果皮色 アントシアニン

## 1. 研究開始当初の背景

セイヨウナシを始めとする果樹において枝変わりと呼ばれる突然変異が発生する現象がしばしば観察される。これは、樹体の一部の枝に突然変異が起こり様々な形質変異を示すもので、果実の色や形、成熟時期の早晚性などの園芸的利用の幅を拡大する役割を果たす形質を示す場合が多い。実際多くの枝変わりが品種として登録されており、商業利用されている。一般的に「洋なし」と呼ばれるセイヨウナシはバラ科に属する落葉果樹で、果実の大きさやサビ(コルク層)といった形質の異なる枝変わりが数多く認められている。それらの枝変わりの中に、通常緑～黄色を示すセイヨウナシにおいて果皮が鮮赤色に変異した枝変わりが存在する。‘スタークリムソン’は‘クラップス・フェボリット’の枝変わりであるとされ、成熟時の果皮色が原品種の‘クラップス・フェボリット’では黄色だが、‘スタークリムソン’は前述のように鮮赤色である。この‘スタークリムソン’に見られる赤着色変異は、変異が果実の最外層(L-I層)のみのため遺伝しない形質とされている(Dayton, 1966)。しかし、近年、‘スタークリムソン’の後代には赤着色を呈する個体が現れることが指摘され(石黒ら, 2008)、Daytonの報告と矛盾した情報が得られている。

セイヨウナシが属するバラ科ナシ亜科果樹において果実の赤着色は果皮におけるアントシアニンの蓄積によるものであることが示されている。リンゴではアントシアニンの主成分は、グルコースを配糖体とするシアニジン-3-グルコシドであり、UDP-glucose-flavonoid 3-o-glucosyl transferase (UFGT) を触媒としてシアニジンから生産される。また、最終産物のシアニジン-3-グルコシドが生成されるまでこの他にも chalcon synthase (CHS)、chalcon isomerase (CHI) などの多くの酵素が関与していることも明らかとなっている。一方、近年、ブドウにおいてアントシアニン生合成に関わる転写因子が Myb であることが明らかとなり(Kobayashi et al, 2004)、リンゴにおいても紫外線によって誘導される myb1(A) 遺伝子が同定され、果皮の赤着色を誘導することが示されている(Takos et al, 2006)。このように果皮色に関わる知見がリンゴでは数多く蓄積しているにも関わらず、セイヨウナシに関しては、酵素活性の調査より、UDP-galactose-flavonoid 3-o-glucosyl transferase の活性が高く、ガラクトースを配糖体としたアントシアニンを蓄積していることが示唆されている(Steyn et al, 2004)ものの、アントシアニンの特定や生合成に関わる遺伝子群の単離といった生理学的、分子生物学的知見は非常に少ない。

また、食品としての果実という視点から、‘ラ・フランス’に代表される黄緑色の果皮をもつ品種が多数を占めるセイヨウナシの

中で、鮮やかな赤色を示す果実は消費者の目を引き、今後需要がさらに伸びると予想されている。特に赤い果実のイメージが強いリンゴに比べ、黄緑色の果実というイメージが強いセイヨウナシでは赤着色果実の魅力が際立つといえる。したがって、赤果皮色を持つ良食味のセイヨウナシの品種育成は強く望まれており、果樹のような永年性の作物の育種に有用な分子マーカーの開発が必須と考えられる。

## 2. 研究の目的

セイヨウナシに見られる赤着色変異について、赤着色の変異メカニズムを解明することでゲノム領域内の変異を見出し、その知見から新品種の育種のための DNA マーカーを開発することを目的とする。すなわち、アントシアニン生合成に関わる遺伝子の発現解析やゲノム解析による分子生物学的なアプローチにより‘スタークリムソン’の赤着色変異の原因因子を明らかにする、さらに分離集団を利用した遺伝解析により遺伝学的なアプローチにより赤着色形質の遺伝解析を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1)セイヨウナシ‘スタークリムソン’(全面赤着色)を実験に供試した。開花直前に半数の花そうに遮光処理を行い、満開日から収穫日まで計6回果皮のサンプリングを行った。それぞれの果皮から total RNA を抽出し、cDNA 合成後、リアルタイム PCR 法にてアントシアニン生合成に関わる 6 遺伝子(CHI、CHS、DFR、F3H、ANS、UFGT)の発現解析を行った。

(2)セイヨウナシ‘マックス・レッド・バートレット’(陽光面赤着色)‘カリフォルニア’(陽光面赤着色)および‘ロージー・レッド・バートレット’(全面赤着色)の3品種ならびに対照として‘バートレット’(緑)を実験に供試した。開花期から収穫期まで約30日おきに計5回果皮を採取し、アントシアニン、クロロフィル、カロテノイド含量を測定した。また、収穫後の果実に対して7日間の予冷と20℃恒温での追熟処理を行い、7日おきに上記の各色素含量に加え果皮の明度、彩度、色相を測定した。また、ANS、UFGT および myb10 の発現解析をリアルタイム PCR 法で行った。

(3)‘バートレット’、‘マックス・レッド・バートレット’、‘カリフォルニア’、‘ロージー・レッド・バートレット’、‘クラップス・フェボリット’、‘スタークリムソン’、‘ドワイエネ・デュ・コムス’および‘リーガル・レッド・コムス’の未展開の幼葉を実験に供試した。凍結保存したセイヨウナシ8品種の幼葉よりゲノム DNA を抽出し、制限酵素 EcoRI、BamHI および XbaI で消化後、ANS、UFGT および myb10 の3遺伝子の部分配列をプローブとした DNA プロット分析を行った。

## 4. 研究成果

(1)赤着色変異セイヨウナシ‘スタークリムソン’の遮光果実と通常果実の果皮を開花

期から収穫期、追熟終了まで経時的に採取し、その果皮におけるアントシアニン生合成系遺伝子の発現解析を行った。通常果実と遮光果実で比較を行った結果、全ての遺伝子において通常果実における遺伝子発現が遮光果実を上回っており、中でもANSにおいてその差が約7万倍と非常に大きいものであった(図1)。またこの最も大きな発現量の差が認められた6月は、果皮に含まれるアントシア

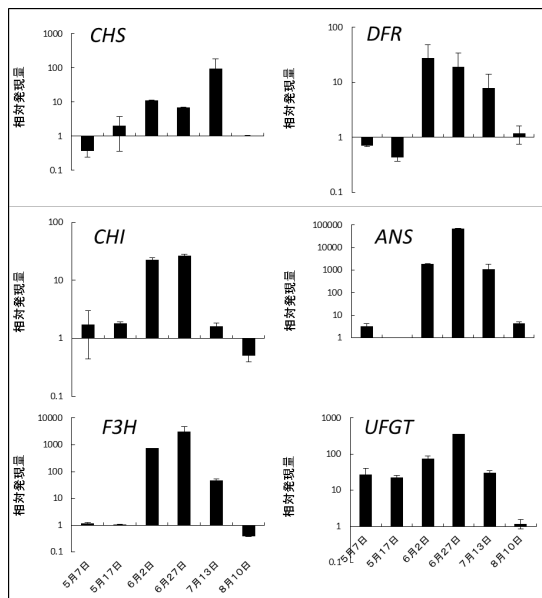


図1. アントシアニン生合成系の各遺伝子発現量の比較  
 バーは標準誤差を示す  
 各遺伝子の発現量は遮光した果実での発現量を1として、相対発現量で示した。

ニン含量が最も上昇した時期であることも確認され、このことからセイヨウナシの果皮における着色にはANSが非常に強く関与していることが示唆された。

また、セイヨウナシの赤着色には全面着色タイプと陽光面着色タイプが存在するが、これらの着色タイプの違いが果皮に含まれるアントシアニン含量やその生成パターンに違いがあるかを確認するため‘バートレット’の枝変わり変異体で全面着色タイプの‘ロージーレッドバートレット’、陽光面着色タイプの‘マックスレッドバートレット’、‘バートレット’の後代で陽光面着色タイプの‘カリフォルニア’を用い、生育期間および追熟期間中の果皮の色素含量を経時的に調査した。その結果、‘ロージーレッドバートレット’は生育期間中アントシアニン含量が増加を続けており、他の品種とは全く異なるアントシアニン合成を示した(図2)。一方、陽光面着色タイプの‘マックスレッドバートレット’や‘カリフォルニア’は6-7月がアントシアニン合成のピークを迎え、‘スタークリームソン’と同様の傾向を示した。これらのことから、セイヨウナシの果皮において、アントシアニン含量は着色タイプによってその

合成能が異なるわけではなく、特定の品種に固有の色素メカニズムが存在することが明らかとなった。

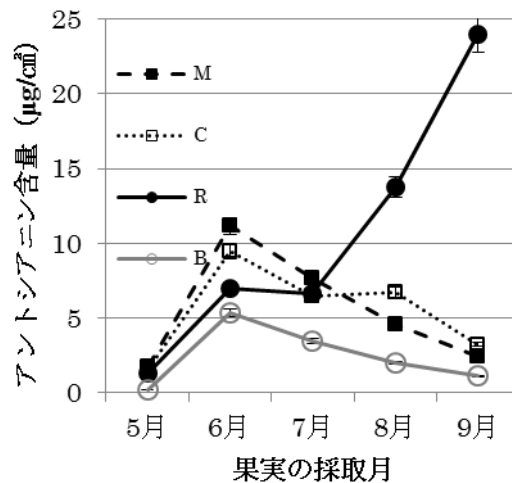


図2. 生育期間中のアントシアニン含量  
 バーは標準誤差を示す。

‘バートレット’の枝変わり変異体で全面着色タイプの‘ロージーレッドバートレット’、陽光面着色タイプの‘マックスレッドバートレット’、‘バートレット’の後代で陽光面着色タイプの‘カリフォルニア’を用い、生育期間中の果皮における、アントシアニン生合成に関与する遺伝子ANS、UFGTおよび転写因子myb10の発現解析を行った。その結果、UFGTの発現量は生育初期の6月において各品種で特に差がみられ、その時期は赤着色品種の着色開始時期と重なっていた(図3)。また、

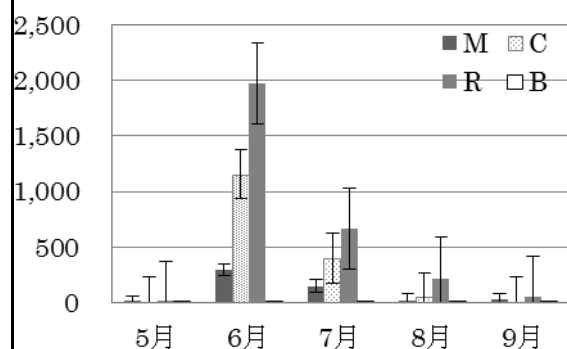


図3. リアルタイムPCRを用いた発現解析におけるUFGT遺伝子の相対発現量の時系列的変化  
 バーは標準誤差を示す。

ANSの7月、UFGTの6月の発現量はmyb10の発現量が増加した翌月に増加した。このことから、myb10はANSまたはUFGTの発現を調節する転写因子であることが示唆された。この結果は、これまでの‘スタークリームソン’における発現解析の結果、すなわち着色機構にはANSが重要であることをさらに裏付けるものであった。

上記の発現解析の結果から、セイヨウナシ果実の赤着色形質にアントシアニン合成に

関わる ANS 遺伝子および UFGT 遺伝子が強く関与し、それらの遺伝子の発現は myb 転写因子によって調節されることが示唆されている。それを踏まえて今年度は、赤着色に関わるアントシアニン生合成関連遺伝子 ANS 遺伝子、UFGT 遺伝子および転写因子 myb10 について DNA プロット分析によるゲノム構造解析を行い、枝変わり前後の着色メカニズムの違いがゲノム上に存在するかどうか検証した。3種類の制限酵素を使用し、セイヨウナシ緑色果皮品種およびその枝変わりと後代品種の計8品種、すなわち‘バートレット’の枝変わり変異体で全面着色タイプの‘ローゼレッドバートレット’、陽光面着色タイプの‘マックスレッドバートレット’、‘バートレット’の後代で陽光面着色タイプの‘カリフォルニア’、全面着色タイプの‘スタークリムソン’および原品種‘クラップス・フェボリット’、全面着色タイプの‘リーガルレッド・コムス’および原品種‘デュワイネ・デュコムス’についてゲノム構造解析を行った。その結果、品種では多型が認められたが、こ

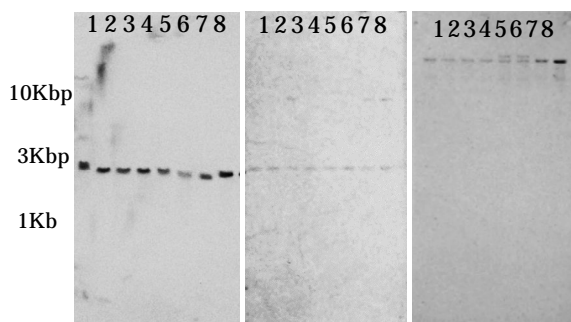


図4. UFGTプローブを用いた DNA プロット分析  
(左から *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*)  
1: B, 2: M, 3: Ca, 4: R, 5: Cl,  
6: St, 7: Cm, 8: RCm

これらの多型は原品種と枝変わり品種間や後代の品種間で同じであり着色形質との関連性は低いと推察された(図4)。すなわち、赤着色形質を制御する鍵因子は1塩基多型などのわずかな変異もしくは非転写領域の変異に起因するものである可能性が高く、それらを明らかにするためにはコード領域内外のシーケンス解析などによりさらに詳細な解析が必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Nongluk Charoenchongsuk, Kazuo Ikeda, Akihiro Itai, Akira Oikawa, Hideki Murayama. Comparison of the expression of chlorophyll-degradation-related genes during ripening between stay-green and yellow-pear cultivars. 査読有 Scientia

Horticulturae 181 2015 p89-94

[学会発表](計 1件)

池田和生・瀬賀美貴・高橋柚稀・高橋由信・村山秀樹 着色タイプの異なる赤着色系セイヨウナシのアントシアニンの蓄積 園芸学会平成26年度秋季大会 2014年9月28日、佐賀大学。

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池田 和生 (IKEDA, Kazuo)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号: 80555269

##### (2)研究分担者

なし( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

なし( )

研究者番号: